

# Triagem fitoquímica, atividade antioxidante e leishmanicida do extrato hidroetanólico 70% (v/v) e das frações obtidas de *Annona crassiflora* Mart.

Phytochemical screening, antioxidant and leishmanicidal activity of the hydroethanolic extract 70% (v / v) obtained from fractions *Annona crassiflora* Mart.

DOI 10.5935/2446-4775.20160036

<sup>1</sup>SILVA, Marcelo A. da\*; <sup>1</sup>ROSA, Carla P.; <sup>1</sup>BASTOS, Renan G.; <sup>1</sup>SILVA, Ana F. da; <sup>1</sup>SILVA, Geraldo A. da; <sup>2</sup>MARQUES, Marcos J.; <sup>2</sup>ESPURI, Patrícia F.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Alfenas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Medicamentos, MG, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Alfenas, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Patologia e Parasitologia, MG, Brasil.

\*Correspondências: [marcelo.silva@unifal.mg.edu.br](mailto:marcelo.silva@unifal.mg.edu.br)

## Resumo

A fitoterapia é uma prática sociocultural presente ao longo dos anos e utilizada para tratar enfermidades que acometem o ser humano. Nesse contexto, a *Annona crassiflora* Mart. destaca-se por ser uma das espécies utilizadas na fitoterapia pouco estudada química e biologicamente. Conhecida popularmente como marolo denota, segundo a literatura científica, uma constituição química composta por ácidos fenólicos, alcaloides, flavonoides, taninos, terpenoides e acetogeninas. Esses ativos são responsáveis pelo grande potencial farmacológico da espécie onde se destacam as atividades antimicrobianas, antioxidantes, citotóxicas, leishmanicidas e hipoglicêmicas. Considerando o exposto, este estudo propôs investigar do ponto de vista químico e biológico a espécie *Annona crassiflora*. Para esse fim, foi obtido o extrato hidroetanólico 70% (v/v) e frações hidroetanólicas das folhas de marolo. Com essas amostras realizou-se uma triagem fitoquímica que permitiu a detecção de compostos como: alcaloides, flavonoides, taninos, terpenos, ácidos fenólicos e catequinas. Avaliou-se, também, a atividade antioxidante pelo método sequestrante do radical DPPH, e os valores das frações hidroetanólicas revelaram-se mais significativos comparados ao extrato hidroetanólico. A atividade leishmanicida foi executada utilizando placas de 96 poços e os resultados mostraram que o extrato e as frações apresentaram-se inativos contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

**Palavras-chave:** *Annona crassiflora*. Metabólitos secundários. Antioxidante. Leishmanicida. Triagem fitoquímica.

## Abstract

Phytotherapy is a sociocultural practice present over the years and used to treat diseases that affect humans. In this context, *Annona crassiflora* Mart. is notable for being one of the species used in phytotherapy, seldom studied chemically or biologically. Popularly known as “marolo”, its chemical constitution is composed of phenolic acids, alkaloids, flavonoids, tannins, terpenoids and acetogenins, according to scientific literature. The presence of these actives is responsible for the great pharmacological potential of this species, where the antimicrobial, antioxidant, cytotoxic, leishmanicidal and hypoglycemic activities stand out. Considering this, the present study proposes to investigate the *Annona crassiflora* species from the chemical and biological point of view. For this purpose, we obtained hydroethanolic extract 70% (v/v) and fractions from the marolo leaves. With these samples, a phytochemical screening was carried out, which allowed us to detect compounds such as alkaloids, flavonoids, tannins, terpenes, phenolic acids and catechins. We also assessed the antioxidant activity using the DPPH radical capturing method, where the values of the hydroethanolic fractions were more significant compared to its extract. The leishmanicidal activity was performed using 96-well plates and the results show that both the extract and the fractions were inactive against the promastigote forms of *Leishmania amazonensis*.

**Keywords:** *Annona crassiflora*. Secondary metabolites. Antioxidant. Leishmanicide. Phytochemical screening.

---

## Introdução

A fitoterapia é uma prática popular difundida em todo mundo, e as espécies da família Annonaceae são amplamente utilizadas pela medicina tradicional para diversos fins terapêuticos. Sabe-se que, em algumas espécies de Annonaceae, há pesquisas confirmando a presença de substâncias potenciais para o uso medicinal, que vão além das crenças populares, o que permite investigar novas alternativas para o controle e cura de enfermidades (DUTRA et al., 2014; FLORENCE et al., 2014; ISLAM, KOORBANALLY e MOHAMMED, 2016; WOGUEM et al., 2014).

A espécie *Annona crassiflora* Mart., pertencente a família Annonaceae, possui compostos químicos que desempenham diferentes atividades farmacológicas. Essa espécie é encontrada em algumas regiões do nordeste, sudeste, sul e centro-oeste. É conhecida popularmente como araticum, marolo, pinha do cerrado, cabeça de negro, entre outros (JORGE e LUZIA, 2013).

Por meio da literatura é possível conhecer sobre as atividades farmacológicas e os compostos químicos de *Annona crassiflora* Mart. Os trabalhos relatam atividade antiprotozoária (OLIANI, 2012), atividade citotóxica (PIMENTA et al., 2011), antitumoral (GONÇALVES, MOSQUEIRA e PIMENTA, 2010) e antioxidante (ROESLER et al., 2007). Muitas vezes a atividade farmacológica de um extrato pode ser elevada se, a partir deste, for realizado um fracionamento. Assim, se dispor de uma fração com melhor atividade significa estar mais concentrada de princípios ativos. Sabendo-se das propriedades farmacológicas que a espécie possui e pretendendo-se aumentar a concentração de compostos químicos de um extrato são produzidas frações (LUENGAS-CAICEDO, 2005).

Poucos estudos etnomedicinais, fitoquímicos e farmacológicos existem sobre essa importante espécie. A fim de buscar dados científicos sobre *Annona crassiflora*, com o intuito de colaborar para o conhecimento da espécie, esse trabalho avaliou a atividade antioxidante e leishmanicida do extrato hidroetanólico 70% (v/v) e de frações, além de detectar os constituintes químicos das folhas de *Annona crassiflora* Mart.

## Material e Método

### Obtenção e identificação do material vegetal

As folhas de *Annona crassiflora* foram coletadas em Outubro de 2013, no município de Paraguaçu-MG, bairro Costa do Sol. A planta foi identificada pelo Professor Doutor Geraldo Alves da Silva e a exsicata do material botânico foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Alfenas, Campus Alfenas-MG, e registrada sob o número 2538.

As folhas coletadas foram submetidas à secagem em estufa de circulação e renovação de ar a 45°C durante 72h. Após a secagem, o material vegetal passou por uma divisão grosseira seguida de uma pulverização em moinho de facas. O pó obtido foi armazenado em frascos de vidro âmbar devidamente rotulados.

### Preparo do extrato hidroetanólico 70% (v/v)

O extrato hidroetanólico 70% (v/v) (ExHd) foi obtido, por percolação simples, segundo Alves, Morgado e Prista (2008). Em seguida, os percolados produzidos foram concentrados em rotaevaporador a temperatura de 50°C. O ExHd concentrado foi transferido para vidros tarados e armazenados em geladeira até o momento da secagem em liofilizador. Posteriormente, o ExHd foi congelado e submetido ao processo de liofilização nas condições ideais de pressão (380 µHg), de temperatura (- 40°C) e de tempo de liofilização (72 horas).

A escolha do extrato hidroetanólico foi estabelecida com o intuito de enriquecer a amostra de princípios ativos polares, os quais possuem atividade antioxidante e leishmanicida descrita na literatura.

### Obtenção das Frações Hidroetanólicas obtidas por Sephadex LH-20 do extrato hidroetanólico 70% (v/v) das folhas de *Annona crassiflora*

O fracionamento do ExHd das folhas de *Annona crassiflora* foi realizado em Cromatografia de Exclusão em coluna (48,0 cm x 4,5 cm) Sephadex LH-20. Para o preparo da Sephadex, esta foi, previamente, intumescida por 24 horas com metanol e, em seguida, transferida para a coluna de vidro até se obter a sedimentação total do suporte. 1 g da amostra foi solubilizada em 200 mL de metanol e, então, aplicada no topo da coluna. Em seguida, procedeu-se a eluição com metanol sendo coletadas frações de 50 mL (LAGE et al., 2014).

O fracionamento foi monitorado por CCD em placa de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (5 x 5 cm), eluídas em metanol: acetato de etila: clorofórmio (3:5:2) sendo as placas, posteriormente, reveladas com anisaldeído (BLADT e WAGNER, 2009). As frações que mostraram semelhança cromatográfica foram reunidas.

Após a junção das frações semelhantes, as mesmas foram colocadas em chapa aquecedora, na temperatura de 50°C, para completa evaporação do solvente. Após secagem, as frações obtidas do extrato

seco hidroetanólico 70% (v/v) por Sephadex LH-20 (FH), foram armazenadas em vidros hermeticamente fechados e mantidos em dessecador provido de sílica até o momento de uso. As frações foram utilizadas para a realização da atividade leishmanicida e antioxidante. O rendimento das frações foi calculado pela expressão: Rendimento (%) = (massa do extrato/massa do material vegetal) x 100.

#### **Análise química por Cromatografia em Camada Delgada**

O ExHd e FH foram dissolvidos em metanol a fim de se obter uma concentração de 1 mg/mL. Em seguida 10 µL das amostras foram aplicadas a 0,5 cm da base de placas de alumínio com sílica gel 60 F<sub>254</sub> (5 x 5 cm). Foram utilizados como fase móvel dois sistemas solventes, o primeiro constituído por metanol: acetato de etila: clorofórmio (3:5:2) e o segundo por clorofórmio:metanol (95:5). Os solventes percorreram 4 cm a partir do ponto de aplicação das amostras.

Posteriormente, as cromatoplasmas foram observadas sob luz UV 254nm e, em seguida, reveladas com o anisaldeído sulfúrico e aquecidas em estufa a 100 °C. As classes de substâncias foram determinadas pela comparação das colorações das manchas observadas nas placas, após a revelação, com as colorações das classes descritas na literatura (BLADT e WAGNER, 2009).

#### **Análise quantitativa da atividade antioxidante pelo método do radical DPPH**

A medida da atividade sequestrante de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) do ExHd e das FH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Chang, Duh e Yen (2005), com modificações, monitorando-se o consumo do radical DPPH pelos componentes das amostras, através da medida do decréscimo da absorbância de soluções de diferentes concentrações. Foram preparadas as soluções das amostras em etanol absoluto nas concentrações de 400,00 µg/mL, 200,00 µg/mL, 100,00 µg/mL, 50,00 µg/mL, 25,00 µg/mL, 12,50 µg/mL, 6,25 µg/mL, 3,12 µg/mL e 1,56 µg/mL.

Utilizou-se como padrão a quercetina, ácido ascórbico e o BHT nas mesmas concentrações das amostras. Adicionou-se 2,0 mL da solução das amostras a serem testadas a 0,5 mL de solução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) (0,5 mM). A mistura foi agitada vigorosamente e mantida em repouso, sob a proteção de luz, por 30 minutos. Logo após, foram feitas as leituras das absorbâncias a 517 nm em espectrofotômetro (Biospectro SP-220) ajustando o zero de absorbância com a solução do branco, constituída de todos os reagentes e 2 mL de etanol absoluto, que substitui a solução das amostras. A propriedade de sequestro foi calculada em porcentagem de radicais DPPH sequestrados, usando a seguinte equação: Sequestro DPPH (%) = [(Ab – Aa) / Ab] x 100. Nessa expressão Ab é a absorbância do branco da amostra e Aa é a absorbância da solução-amostra. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos pela concentração de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (IC<sub>50</sub>).

O IC<sub>50</sub> foi determinado usando o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) a partir de uma curva exponencial de primeira ordem, obtida plotando-se na abscissa as concentrações da amostra (µg/mL) ou do controle positivo e na ordenada, a porcentagem de DPPH remanescente.

## Avaliação da atividade leishmanicida contra formas promastigotas

As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/71973/M2269) foram cultivadas de forma axênica, utilizando meio LIT (Liver Infusion Triptose) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As cepas foram mantidas em estufa BOD, a 28°C. Para o crescimento exponencial, foi adicionado o meio de cultura, a cada 3 dias, em cada cultura, e estas foram submetidas a um repique semanal. Contagem de formas promastigotas foi feita em câmara de Neubauer e a concentração foi ajustada para  $1,0 \times 10^6$  parasitos/mL. 100 µL dessa suspensão foram adicionados a cada poço de uma placa de 24 poços, em triplicata, contendo 1,0 mL de meio LIT. Logo após essa etapa, 6 µL de concentrações de cada um dos extratos secos, em DMSO (40, 10, 5 e 0,1 µg/mL) foram adicionados aos poços contendo promastigotas. Anfotericina B foi utilizada como droga de referência, na mesma concentração do extrato e frações. Além disso, foi adicionado controle negativo (meio), controle positivo (meio + parasitos) e o branco (meio + parasito + DMSO). As placas foram incubadas em estufa BOD, a 28°C, por 72 horas.

Após esse período, foram adicionados, a cada poço da placa, 100 µL de corante resazurina a 1 mg/mL em tampão fosfato PBS (1:9) e, após cerca de 4 horas, foi realizada a leitura da reação a 570 nm e a 600 nm, utilizando um leitor de microplacas. A porcentagem de inibição da proliferação foi calculada a partir da fórmula:

% inibição =  $100 - [A570 - (A600 \times R0) \text{ Tratado} / A570 - (A600 \times R0) \text{ Controle positivo}] \times 100$ , em que A570 é a absorbância a 570 nm, A600 é a absorbância a 600 nm e R0 é o fator de correção, calculado a partir dos valores de absorbância do controle negativo, ou seja, apenas meio de cultura e resazurina, na ausência de parasitos [ $R0 = (A570 / A600)$ ].

## Análise Estatística

Todos os ensaios foram conduzidos pelo menos três vezes com três preparações de amostras e os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. O IC<sub>50</sub> foi calculado utilizando o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA)..

## Resultados e Discussão

### Rendimento do extrato seco das frações de *Annona crassiflora*

O rendimento do ExHd das folhas de *Annona crassiflora* foi de 21,57%. Os rendimentos das FH foram de 3,8 % (FH: 12-17) e de 3,1 % (FH: 75-109).

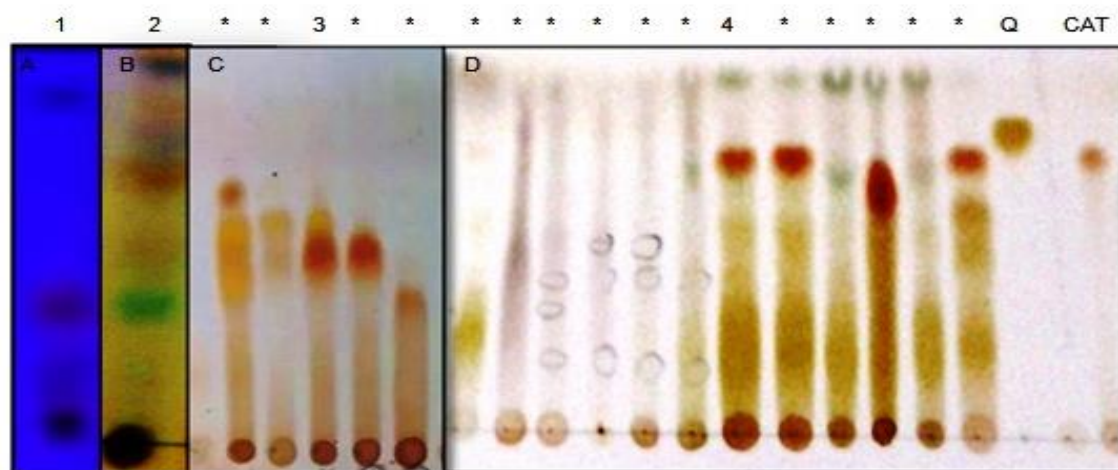
O fracionamento por cromatografia em coluna do ExHd das folhas de *Annona crassiflora* produziu 180 frações. Destas, apenas duas foram selecionadas (FH: 12-17, FH: 75-109) devido a presença de compostos fenólicos que poderiam possuir efeito leishmanicida e antioxidante (ASSIS et al., 2012; INFANTE, 2013; KUMAR e PANDEY, 2013; MARIEM et al., 2014; ROCHA et al., 2005). Segundo Delorenzi e colaboradores (2001) os alcaloides também são relatados por apresentarem atividade antileishmania.

Outras frações também apresentaram esses compostos, porém não possuíam quantidades suficientes, em massas, para a análise leishmanicida e antioxidante.

### Triagem fitoquímica dos extratos secos e das frações por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A análise química por CCD buscou caracterizar a presença dos constituintes majoritários presentes no ExHd e nas FH das folhas de *Annona crassiflora* por dois sistemas eluentes com diferentes polaridades (FIGURA 1).

FIGURA 1- Perfil cromatográfico por Cromatografia em Camada Delgada do extrato e das frações das folhas de *Annona crassiflora*.



Fonte: Dados do autor.

Nota: A e B - Sistema eluente: clorofórmio: metanol (95:5). 1 e 2- extrato hidroetanólico 70% (v/v) das folhas de *Annona crassiflora*. C e D - Sistema eluente: metanol: acetato de etila: clorofórmio (3:5:2). 3- Fração hidroetanólica (FH: 12-17), 4- Fração hidroetanólica (FH: 75-109); Q: Padrão Quercetina; CAT- Padrão Catequina. A - Fase estacionária: sílica gel 60 F<sub>254</sub>. Revelador: UV-254nm. B, C, D - Fase estacionária: sílica gel 60 F<sub>254</sub>. Revelador: anisaldeído sulfúrico/aquecimento a 100°C.

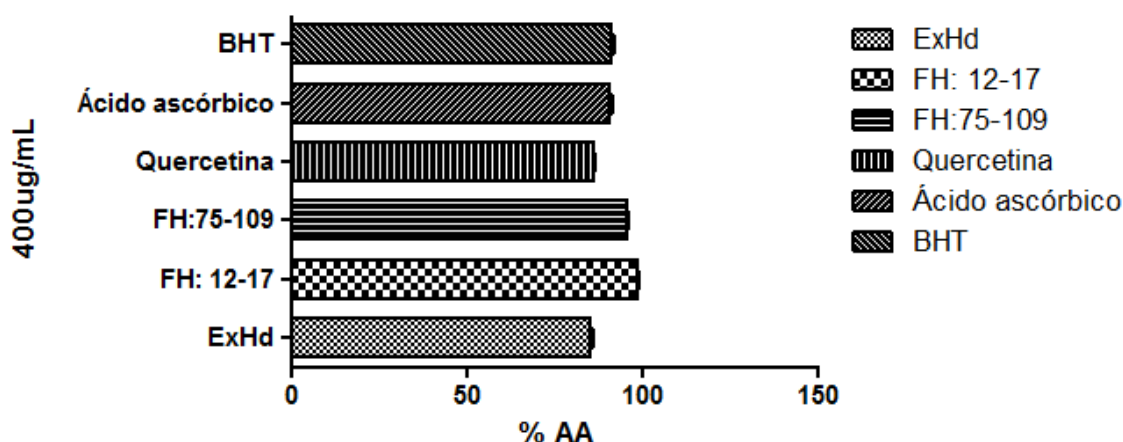
\*Frações obtidas do extrato hidroetanólico 70% (v/v), por Sephadex-LH20, das folhas de *Annona crassiflora* e que não foram utilizadas na análise leishmanicida e antioxidante.

A análise do perfil cromatográfico foi realizada pela comparação das colorações das manchas observadas nas placas após serem reveladas, com as colorações das classes descritas na literatura (BLADT e WAGNER, 2009). Foi possível observar e inferir quanto as classes de metabólitos secundários presentes no ExHd e FH, provenientes das folhas de *Annona crassiflora*, alcaloides caracterizados pela mancha verde (B-2) e fluorescência na luz UV 254nm (A-1) ; taninos devido a coloração marrom retida no ponto de aplicação (B-2; C-3; D-4); flavonoides caracterizados pela mancha amarelada (C-3; D-4) catequinas pela coloração avermelhada (D-4) e terpenos, provavelmente núcleo triterpenicos e/ou núcleo esteroidal glicosilado, caracterizados pela coloração arroxeada (A-1).

### Atividade antioxidante quantitativa pelo método do radical DPPH

A atividade antioxidante de *Annona crassiflora*, avaliada pelo método DPPH, é apresentada na (FIGURA 2). Por meio dos resultados observou-se uma relação dose-resposta onde os valores indicam uma potente atividade antioxidante das amostras comparadas aos padrões.

FIGURA 2- Extrato e frações das folhas de *Annona crassiflora*, padrões e a sua capacidade sequestrante de radicais DPPH.



Fonte: Dados do autor.

Nota: ExHd: Extrato Hidroetanólico 70% (v/v); FH: 12-17 e FH: 75-109: Frações hidroetanólicas obtidas do extrato hidroetanólico 70% (v/v) por Sephadex; BHT: butil-hidroxitolueno.

Os percentuais de ação antioxidante (% AA) mostraram-se bastante expressivos para todas as amostras em todas as concentrações testadas. Algumas, na concentração de 400 µg/mL, conseguiram atingir quase que 100% de sequestro de radicais DPPH *in vitro*. As frações (F2: 12- 17: 97,12 ± 0,80%; F2: 75-109: 99,51 ± 0,70%) apresentaram valores de % AA mais expressivos.

Os resultados na concentração de 400 µg/mL do extrato hidroetanólico (85,91 ± 0,80) foi próximo ao apresentado pela quercetina (86,05 ± 0,60), um flavonoide de ocorrência natural, bem conhecido pelas suas potentes propriedades antioxidantes. Esse estudo está em concordância com o trabalho de Baskar, Rajeswari e kumar (2007) que ao avaliarem a capacidade depurativa dos radicais DPPH das folhas de três espécies de *Annona* na concentração de 400 µg/mL, revelaram teores semelhantes ao desse estudo. Os resultados encontrados para *Annona muricata* foi de 83,89%, *Annona squamosa* de 87,47% e para *Annona reticulata* foi de 81,63%.

Estes achados sugerem que o extrato de *Annona crassiflora* possui potente atividade antioxidante *in vitro* em comparação com as folhas de *Annona muricata* e *Annona reticulata*, sugerindo seu papel como um agente de remoção eficaz de radicais livres, aumentando seu valor terapêutico quando se aborda patologias relacionadas ao estresse oxidativo.

Além de avaliar a % AA, determinou-se a concentração da amostra necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50% (IC<sub>50</sub>) (TABELA 1). Uma atividade antioxidante mais elevada é apontada por um valor mais baixo de IC<sub>50</sub>. A melhor atividade de eliminação de radicais livres foi obtida com a fração FH: 75-109 apresentando um IC<sub>50</sub> de 7,207 µg/mL.

Essa descoberta supera os resultados de Lima, Pimenta e Boaventura (2010) que mostraram valor de IC<sub>50</sub> de 33,9 µg / mL para o extrato etanólico de *Annona cornifolia*. Nos estudos de Loizzo e colaboradores (2012) a atividade de eliminação de radicais DPPH do extrato etanólico de *Annona cherimola* demonstrou um valor de IC<sub>50</sub> (72.2 µg/mL) inferior ao encontrado neste estudo.

Os valores de IC<sub>50</sub> encontrados para *Annona crassiflora* mostram-se mais expressivos comparado aos outros gêneros. Tal fato pode ser explicado pela particularidade da espécie, pela constituição do extrato, pela parte vegetal utilizada, pelo solvente empregado, local e época de coleta. De acordo com Simões e colaboradores (2010), as substâncias ativas em uma planta podem estar limitadas a uma estação do ano ou a certas condições ambientais, ou ainda a certas variedades ou cultivares.

**TABELA 1-** Atividade antioxidante do extrato e das frações das folhas de *Annona crassiflora* pelo método do radical DPPH.

Amostras	IC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )
ExHd	35,570
FH: 12-17	22,950
FH: 75-109	7,207
Quercetina	0,666
Ácido Áscórbico	2,106
BHT	5,597

Fonte: Dados do autor.

Nota: ExHd: Extrato Hidroetanólico 70 %; FH: 12-17 e FH: 75-109: Frações hidroetanólicas obtidas do extrato hidroetanólico 70% (v/v) por Sephadex; BHT: butil-hidroxitolueno.

Ao observar a análise química em CCD é visto que a fração FH:75-109 retrata flavonoides, dentre eles, a catequina, sugerida por apresentar mesmo Rf e coloração do padrão, além dos taninos observados pela mancha marrom retida no ponto de aplicação. Conforme estudos, existe uma relação entre a atividade antioxidante de produtos vegetais e seu conteúdo fenólico, onde se concluiu que maiores teores de flavonoides e de outros polifenóis, entre eles os taninos, resultam em melhores atividades de depuração de DPPH (EBRAHIMZADEH e BAHRAMIAN, 2009).

Dentre os compostos fenólicos uma característica importante dos flavonoides é a presença de certos grupos funcionais que lhe conferem maior atividade antioxidante. Dentre esses, podem-se citar, o grupo catecol no anel B, insaturação no anel C, a presença da função 4-oxo no anel C e uma dupla ligação na posição 2,3 conjugada com um grupo 4-oxo (PIETTA, 2000). Diferenças nas avaliações da atividade antioxidante das diferentes amostras, desse estudo, podem ser devido à ausência ou presença desses grupos funcionais. No caso das frações, os flavonoides que apresentam grupos como o catecol, e outros citados acima, foram concentrados aumentando seu potencial antioxidante em relação ao extrato hidroetanólico.

Por fim, esse estudo está em concordância com a literatura que confirma a presença de diversos princípios ativos, descritos para o gênero *Annona* sp, como taninos, flavonoides, fenóis (KALIDINDI et al., 2015), responsáveis por grandes potenciais antioxidante *in vitro*, com destaque para catequina, já confirmada pela ação antioxidante do chá verde (RASHIDINEJAD et al., 2014) e sugerida na análise por CCD.

#### **Avaliação da atividade leishmanicida contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis***

Os resultados contra as formas promastigotas não foram promissores para o ExHd e para as frações FH: 12-17 e FH: 75-109, pois nenhuma das amostras, nas condições experimentais desse estudo, mostraram-se citotóxicas contra o parasita na maior concentração analisada (**TABELA 2; TABELA 3**). Esse fato justifica-se pelas peculiaridades das amostras, isto é, os compostos químicos extraídos possuem características mais polares do que apolares.



**TABELA 2** - Atividade antipromastigota de extrato e frações de *A. crassiflora*.

Amostras	Concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	% AP $\pm$ DP
ExHd	40	0,00 $\pm$ 0,19
ExHd	10	0,00 $\pm$ 0,11
ExHd	5	0,00 $\pm$ 0,10
ExHd	0,1	0,00 $\pm$ 0,10
FH: 12-17	40	0,00 $\pm$ 0,45
FH: 12-17	10	0,00 $\pm$ 0,55
FH: 12-17	5	0,00 $\pm$ 0,09
FH: 12-17	0,1	0,00 $\pm$ 0,14
FH: 75-109	40	0,00 $\pm$ 0,17
FH: 75-109	10	0,00 $\pm$ 0,21
FH: 75-109	5	0,00 $\pm$ 0,24
FH: 75-109	0,1	0,00 $\pm$ 0,31

Fonte: Dados Do autor.

Nota: ExHd: Extrato Hidroetanólico das folhas de *A. crassiflora*; FH: 12-17/FH: 75-109: Fração hidroetanólica obtida por Sephadex; %AP: percentual de atividade antipromastigota; DP: Desvio Padrão.

**TABELA 3** - Determinação das concentrações leishmanicidas 50% (IC50) da população de formas promastigotas e amastigotas do padrão Anfotericina B.

Amostras	Promastigotas IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ DP	Amastigotas IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ DP
ExHd	NR	NR
FH: 12-17/FH: 75-109	NR	NR
Anfotericina B	4,70 $\pm$ 0,1129	NR

Fonte: Dados Do Autor.

Nota - ExHd: Extrato Hidroetanólico das folhas de *A. crassiflora*; FH: 12-17/FH: 75-109: Fração hidroetanólica obtida por Sephadex NR: Não realizado.

Pereira (2012) justifica, em seu estudo, a correlação existente entre a influência da polaridade na atividade leishmanicida, onde se percebe que as frações menos polares tendem a ter uma melhor atividade biológica no modelo Leishmania.

Conforme estudo realizado por Vila-Nova e colaboradores (2011) foi demonstrado atividade leishmanicida contra as formas promastigotas e amastigotas de *Annona squamosa* e *Annona Muricata*. Segundo os autores essa atividade estaria relacionada às acetogeninas (apolar) que foram isoladas e testadas.

Os extratos hexânico e clorofórmico analisados de *Annona glabra* (SILVA et al., 2015) apresentaram boa atividade leishmanicida. O melhor resultado foi constatado com o extrato hexânico com 80,17 % de inibição na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ . Os extratos de maior efeito leishmanicida apresentam compostos menos polares como esteroides e triterpenos.

Considerando as amostras utilizadas, desse estudo, não se prosseguiram os testes contra as formas amastigotas. Visto que, nos ensaios com as formas promastigotas, o extrato e as frações apenas entram em contato direto com o parasita, mas com as formas amastigotas é necessário que as moléculas presentes, na amostra, tenham polaridade e tamanho (massa molecular) adequado para serem capazes

de transpor compartimentos biológicos e exercerem o efeito desejado. Portanto, é indispensável que os compostos rompam as membranas dos macrófagos para atingir o parasita (VILA-NOVA et al., 2013).

Os resultados observados não excluem a possibilidade de se obter uma atividade leishmanicida com a espécie. Deve-se atentar a outros aspectos importantes: a obtenção de extratos menos polares, coleta da espécie em outras regiões do país e em outra época do ano e testar a atividade do extrato sobre outras espécies de *Leishmania*, já que diferentes estirpes possuem sensibilidade distinta em relação aos compostos devido às diferenças de crescimento, fisiologia e bioquímica entre as cepas de *Leishmania* (VILA-NOVA et al., 2013).

Também existe a possibilidade dos princípios ativos estarem concentrados em outras partes da planta (SIMÕES et al., 2010). Delmondes e colaboradores (2014) mostraram que os extratos das folhas, casca e sementes não foram eficazes contra *L. brasiliensis*, porém, o extrato do caule promoveu uma inibição frente ao parasita.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela estrutura e suporte financeiro concedido..

## Referências

ALVES, A.C.; MORGADO, R.M.R.; PRISTA, L. N. *Tecnologia Farmacêutica*. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian. 2008.

ASSIS, D. M.; GONTIJO, V. S.; DE OLIVEIRA, P. I, SANTOS, J. A; CAMPS, I.; NAGEM, T.J.; ELLENA, J.; IZIDORO, M. A.; DOS SANTOS, T. I. L.; DE BARROS, N. M.; DORIGUETTO, A. C.; DOS SANTOS, M. H.; JULIANO, M. A. Inhibition of cysteine proteases by a natural biflavone: behavioral evaluation of fukugetin as papain and cruzain inhibitor. Taylor&Francis. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. v. 28, p. 661-670. 2012. ISSN 1475-6374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

BASKAR, R.; RAJESWARI, V.; KUMAR, S. T. In vitro antioxidant studies in leaves of *Annona* species. CSIR. *Indian Journal of Experimental Biology*. v. 45, p. 480-485. New Delhi, Índia. 2007. ISSN 0975-1009. [[PubMed](#)]

BLADT, S.; WAGNER, H. *Plant Drug Analysis*. Springer-Verlag. 384p. Berlin, 2009. ISBN 364200573X, 9783642005732.

CHANG, L.W.; DUH, P.D.; YEN, W.J. Antioxidant activity of peanut seed testa and its antioxidative component, ethyl protocatechuate. Elsevier. *Food Science Technology*, v. 38, n. 1, p. 193-200. USA. 2005. ISSN 0023-6438. [[CrossRef](#)]

DELMONDES, G. de A.; DE FIGUÊIREDO, F. R. S. D.; TINTINO, S.R.; DE OLIVEIRA, L. R.; MONTEIRO, Á. B.; SALES, V. dos S.; RODRIGUES, C. K. de S.; DO NASCIMENTO, E. P.; GOMEZ, M. C. V.; CORONEL, C.; DA COSTA, J. G. M.; COUTINHO, M. H. D.; FELIPE, C. F. B.; DE MENEZES, I. R. A.; KERNTOPF, M. R. Avaliação da citotoxicidade e atividade leishmanicida e tripanocida de extratos de *Passiflora cincinnata* Mast L. Universidade Regional do Cariri – URCA. *Caderno de Cultura e Ciência*, v.13, p. 31-38. Cariri. 2014. [[CrossRef](#)]. ISSN 1980-5861.

DELORENZI, J. C.; ATTIAS, M.; GATTASS, C. R.; ANDRADE, M.; REZENDE C.; PINTO, Â DA C.; HENRIQUES, A. T.; BOU-HABIB, D. C.; SARAIVA, E. M. B. Antileishmanial activity of an indole alkaloid from *Peschiera australis*. *ASM. Antimicrobial Agents Chemotherapy*. v. 45, p. 1349–1354, Washington. 2001. ISSN 1098-6596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

DUTRA, L.M.; BOMFIM, L.M.; ROCHA, S.L.; NEPEL, A.; SOARES, M.B.; BARISON A.; COSTA, E.V.; BEZERRA, D.P. Ent-Kaurane diterpenes da casca de tronco de *Annona vepretorum* (Annonaceae) e avaliação citotóxica. Elsevier. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. v. 24, p. 3315–3320. USA. 2014. ISSN 0960-894X.

EBRAHIMZADEH, M. A.; BAHRAMIAN, F. Antioxidant activity of *Crataegus pentagina* subsp. elbursis fruits extracts used in traditional medicine in Iran. *ANSI NET. Pakistan Journal of Biological Sciences*. v. 12, p. 413-419. Pakistan. 2009. ISSN 1028.8880. [[Link](#)].

FLORENCE, N.T.; BENOIT, M.Z.; JONAS, K.; ALEXANDRA, T.; DÉsirÉ, D.D.; PIERRE, K.; THÉOPHILE, D. Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata*(Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. Elsevier. *Journal of Ethnopharmacology*. v.151, p. 784–790. USA. 2014. ISSN 0378.8741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

GONÇALVES, M.A.; MOSQUEIRA, V. C. F.; PIMENTA, L. P. S. *Annona crassiflora* Wood Constituents: Antimalarial Efficacy, Larvicidal and Antimicrobial Activity. V.K. Gupta. *Comprehensive Bioactive Natural Products-Efficacy, Safety & Clinical Evaluation I*, v. 2, p. 293-305, 493p., India. 2010. ISBN 1933699523, 9781933699523.

INFANTE, J. *Composição fenólica e atividade antioxidante da polpa, casca, semente e folha de espécies frutíferas nativas do Brasil*, 113 p. Dissertação de Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos, apresentada na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. USP, São Paulo. 2013.

ISLAM, M. S.; KOORBANALLY, N. A.; MOHAMMED, A. Anti-diabetic effect of *Xylopi aethiopic a* (Dunal) A. Rich. (Annonaceae) fruit acetone fraction in a type 2 diabetes model of rats. Elsevier. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 180, p. 131–139. USA. 2016. ISSN 0378.8741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

JORGE, N.; LUZIA, D. M. M. Bioactive substance contents and antioxidant capacity of the lipid fraction of *Annona crassiflora* Mart. Seeds. Elsevier. *Industrial Crops and Products*. v. 42, p. 231-235. USA. 2013. ISSN 0926-6690. [[CrossRef](#)]

KALIDINDI, N.; THIMMAIAH, N.V; JAGADEESH, N.V.; NANDEEP, R.; SWETHA, S.; KALIDINDI, B. Antifungal and antioxidant activities of organic and aqueous extracts of *Annona squamosa* Linn. Leaves. Elsevier. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 23, p. 795-802. USA. 2015. ISSN 1021-9498. [[CrossRef](#)]

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. Hindawi. *The Scientific World Journal*. volume 2013, p. 01-16. New York. 2013. ISSN 2356-6140 [\[Link\]](#) [\[CrossRef\]](#)

LAGE, G. A.; MEDEIROS, F. D. A. S.; FURTADO, W. D. E. L.; TAKAHASHI, J. A.; DE SOUZA FILHO, J. D.; PIMENTA, L. P. The first report on flavonoid isolation from *Annona crassiflora* Mart. Taylor & Francis. *Natural Product Research*, v.28, p. 808-811. USA. 2014. ISSN 1478-6427. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

LIMA, L. A. R. S.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. Elsevier. *Food Chemistry*. v. 122, p. 1129-1138. USA. 2010. ISSN: 0308-8146. [\[CrossRef\]](#)

LOIZZO, M. R.; TUNDIS, R.; BONESI, M.; MENICHINI, F.; MASTELLONE, V.; AVALLONE, L.; MENICHINI, F. Radical scavenging, antioxidant and metal chelating activities of *Annona cherimola* Mill. (cherimoya) peel and pulp in relation to their total phenolic and total flavonoid contents. Elsevier. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 25, p. 179-184. USA. 2012. ISSN 0889-1575. [\[CrossRef\]](#)

LUENGAS-CAICEDO, P.E. *Contribuição para a padronização de extratos de folhas de cecropia glaziovii snethl.: estudos de variação sazonal e intra-específica de flavonóides e proantocianidinas, de metodologias de extração e de atividade vasorelaxante*. 267f. Tese de Doutorado apresentada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Fármacos e Medicamentos, UFMG, Belo Horizonte. 2005.

MARIEM, S.; HANEN, F.; INÈS, J.; MEJDI, S.; RIADH, K. Phenolic profile, biological activities and fraction analysis of the medicinal halophyte *Retama raetam*. Elsevier. *South African Journal of Botany*, v. 94, p. 114-121. USA. 2014. ISSN 0254-6299. [\[CrossRef\]](#)

OLIANI, J. *Estudo químico e avaliação das atividades antiprotozoária e antimicobacteriana in vitro dos alcalóides isoquinolínicos e do óleo volátil de Annona crassiflora Mart. (Annonaceae)*, 228 f.. Dissertação de Mestrado apresentada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo. 2012.

PEREIRA, I. de O. Determinação da atividade leishmanicida, antiproteolítica e antioxidante de *Arrabidaea brachypoda*. Tese de Doutorado apresentada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Araraquara. 2012.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. ACS. *Journal of Natural Products*, v. 63, p. 1035-1042. USA. 2000. ISSN 1520-6025. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

PIMENTA, L. P. S.; MENDONÇA, D. D.; PRETTI, D. L.; CRUZ, B. L. D.; LEITE, E. A.; DE OLIVEIRA, M. C. Evaluation of In-vivo Antitumor Activity of *Annona crassiflora* Wood Extract. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, v. 3, p. 270-273. India. 2011. ISSN 0975-248X.

RASHIDINEJAD, A.; BIRCH, E. J.; SUN-WATERHOUSE, D.; EVERETT, D. W. Delivery of green tea catechin and epigallocatechin gallate in liposomes incorporated into low-fat hard cheese. Elsevier. *Food Chemistry*, v. 156, p. 176-183. USA. 2014. ISSN 0308.8146. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

ROCHA, L. G.; ALMEIDA, J. R.; MACÊDO, R. O.; BARBOSA-FILHO, J. M. A review of natural products with antileishmanial activity. Elsevier. *Phytomedicine*, v. 12, p. 514-535. USA. 2005. ISSN 1618-095X. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

ROESLER, R.; CATHARINO, R. R.; MALTA, G. L.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. Elsevier. *Food Chemistry*, v. 104, p. 1048-1054. USA. 2007. ISSN 0308.8146. [\[CrossRef\]](#)

SILVA, A. A. de S.; ALEXANDRE, J. De B.; VIEIRA, L. G.; RODRIGUES, S. P.; FALCÃO, M. J. C.; DE MORAIS, S. M. Estudo fitoquímico e atividades leishmanicida, anticolinérgica e antioxidante de extratos de *Annona glabra* L. (araticum panã). UNESP. *Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada*. v. 36, p. 189-194. Araraquara. 2015. ISSN 2179.443X. [\[Link\]](#)

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6ª ed. Editora da UFRGS/Editora da UFSC. Porto Alegre/Florianópolis. 2010.

VILA-NOVA, N. S.; MORAIS, S. M.; FALCÃO, M. J. C.; ALCÂNTARA, T. T. N.; FERREIRA, P. A. T.; CAVALCANTI, E. S. B.; VIEIRA, I. G. P.; CAMPELLO, C. C.; WILSON, M. Different susceptibilities of *Leishmania* spp. promastigotes to the *Annona muricata* acetogenins annonacinone and corosolone, and the *Platymiscium floribundum* coumarin scoparone. Elsevier. *Experimental Parasitology*, v. 133, p. 334–338. USA. 2013. ISSN 0014-4894. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

VILA-NOVA, N. S.; MORAIS, S. M.; FALCÃO, M. J. C.; MACHADO, L. K. A.; BEVILÁQUA, C. M. L.; COSTA, I. R. S.; BRASIL, N. V. G. P. DE S.; DE ANDRADE JÚNIOR, H. F. Leishmanicidal activity and cytotoxicity of compounds from two Annonaceae species cultivated in Northeastern Brazil. *SciELO. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 44, p. 567-571. Uberaba. 2011. ISSN 0037-8682. [\[CrossRef\]](#)

WOGUEM, V. FOGANG, H. P.; MAGGI, F.; TAPONDJOU, L. A.; WOMENI, H. M.; QUASSINTI, L.; BRAMUCCI, M.; VITALI, L. A.; PETRELLI, D.; LUPIDI, G.; PAPA, F.; VITTORI, S.; BARBONI, L. Volatile oil from striped African pepper (*Xylopia parviflora*, Annonaceae) possesses notable chemopreventive, anti-inflammatory and antimicrobial potential. Elsevier. *Food Chemistry*. v. 149, p. 183–189. USA. 2014. ISSN 0308-8146 [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

---

**Conflito de interesses:** O presente artigo não apresenta conflitos de interesse.

**Histórico do artigo:** Submissão: 29/03/2016 | Aceite: 18/02/2017 | Publicação: 23/05/2017

**Como citar este artigo:** SILVA, Marcelo A. da; ROSA, Carla P.; BASTOS, Renan G.; SILVA, Ana F. da; SILVA, Geraldo A. da; MARQUES, Marcos J.; ESPURI, Patrícia F. Triagem fitoquímica, atividade antioxidante e leishmanicida do extrato hidroetanólico 70% (v/v) e das frações obtidas de *Annona crassiflora* Mart. *Revista Fitos*. v.10,n.4. p. 505-517. Rio de Janeiro. 2016. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/330>>. Acesso em: 11 maio 2017.

**Licença CC BY 4.0:** Você está livre para copiar e redistribuir o material em qualquer meio; adaptar, transformar e construir sobre este material para qualquer finalidade, mesmo comercialmente, desde que respeitado o seguinte termo: dar crédito apropriado e indicar se alterações foram feitas. Você não pode atribuir termos legais ou medidas tecnológicas que restrinjam outros autores de realizar aquilo que esta licença permite.

---